

# Etude sur la ramulose du cotonnier

## Comparaison du *Colletotrichum* responsable à *C. gossypii* South. Conditions d'attaques

J.C. Follin\* et V. Mangano\*\*

\* Centre de recherches du G.E.R.D.A.T., B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex.

\*\* I.A.N. Caacupe, Paraguay.

### RÉSUMÉ

La comparaison du *Colletotrichum*, agent de la ramulose du cotonnier, et du *Colletotrichum*, agent de l'antracnose, (*C. gossypii* South.) montre que ces deux parasites ne diffèrent pas seulement par leur pouvoir pathogène (virulence et agressivité) mais aussi par leur morphologie, leur croissance sur différents milieux et leur aptitude à se développer au-dessus de 30°C. Ces différences ne permettent pas de faire de l'agent de la ramulose un cultivar particulier de *C. gossypii* South. Il est proposé comme

MOTS CLES : Paraguay, ramulose du cotonnier, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. var. *cephalosporioides* Costa, *Colletotrichum gossypii* South.

### INTRODUCTION

En 1931, dans plusieurs plantations de cotonnier de l'Est du Paraguay (zone de Chore et de Caaguazu) on a observé une maladie non encore signalée dans ce pays. Les cotonniers atteints ont un aspect ramifié anormal et ces ramifications anarchiques sont d'autant plus importantes que la maladie est apparue tôt. Les entrenœuds sont courts et les nœuds gonflés. Les feuilles sont plus petites que les feuilles normales et de couleur vert foncé; les limbes présentent au niveau des nervures des nécroses rondes, rouges, qui provoquent un développement inégal des feuilles et donnent souvent un aspect déchiqueté aux plus âgées. Sur le haut de la tige principale et sur les jeunes rameaux, des lésions sont visibles, de même que sur les capsules, et des acervules de *Colletotrichum* y sont souvent présentes.

Ces symptômes correspondent à ceux de la ramulose ou « superbrotaemento », maladie du cotonnier décrite pour la première fois par COSTA et FRAGA en 1937 (2) au Brésil et plus récemment par MALAGUTTI (7) au Venezuela (sous le nom d'« escobilla »).

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Dans les tests préliminaires, il n'a pas été observé de différences dans les souches provoquant la ramulose (originaires de Chore et Caaguazu), d'une part, et dans celles provoquant l'antracnose (originaires de Côte-d'Ivoire et d'Afrique centrale), d'autre part. Seules deux souches ont donc été conservées : l'une, Ra, isolée de tige à Caaguazu pour la ramulose, et l'autre, As, isolée de plantules en Afrique centrale.

Les deux champignons ont été cultivés sur bouillon de petits pois gélosé et sur milieu Czapeck seul ou additionné d'extrait de levure (3 g/l) ou d'hydrolysate de caséine sans vitamines (2 g/l).

#### Tests de pathogénicité, inoculations artificielles

Toutes les expériences sont réalisées à 25°C, 80 % H.R. et alternance jour-nuit 12 h-12 h. La variété de cotonnier utilisée est Reba P 279, originaire du Paraguay (B 50 × DPSL).

**Plantules :** Les graines sont trempées pendant 2 heures dans une solution de spores (10<sup>7</sup> spores/ml), puis séchées pendant 12 h et semées sur vermiculite imbibée d'une solution minérale nutritive. On note les plantules mortes 6, 8 et 10 jours après

dénomination : *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. var. *cephalosporioides* Costa pour l'agent responsable de la ramulose.

Pour provoquer des symptômes, le champignon demande au moins 8 à 10 heures d'humidité relative voisine de 100 % à une température autour de 25°C. Une période de sécheresse permet la guérison de la plante si la maladie est installée.

L'isolement régulier à partir des différents organes malades (capsules, bourgeons terminaux, rameaux) d'un même *Colletotrichum* et le succès des premiers tests de pathogénicité ont confirmé ce diagnostic (8).

N'ayant pu trouver une diagnose claire de ce dernier champignon et les symptômes de l'antracnose et de la ramulose étant fort éloignés, il nous a semblé utile de vérifier si le *Colletotrichum* de la ramulose appelé *C. gossypii* South. var. *cephalosporioides* Costa par COSTA et FRAGA (3), était réellement une souche particulière issue de *C. gossypii* South. ou si ce champignon se rattachait, comme *C. gossypii*, au grand groupe des *C. gloeosporioides* Penz, dans le sens de VON ARX (10).

Par ailleurs, les conditions les plus favorables pour que le *Colletotrichum* de la ramulose puisse provoquer des symptômes sur cotonnier ont été recherchées en milieu à températures contrôlées.

les semis; à 10 jours, les plantules vivantes sont arrachées et observées. Six répétitions de 16 graines semées sont réalisées.

**Plantes jeunes (20-25 jours) :** Une solution de spores (10<sup>7</sup> spores/ml) est pulvérisée sur de jeunes plants maintenus pendant des durées variables à 100 % H.R. Les résultats sont lus au bout de 6 jours. Quatre répétitions de 8-10 plants sont inoculés.

**Capsules :** La même solution de spores est pulvérisée sur des capsules coupées à 35-40 jours et mises dans une enceinte à 26°C, 100 % H.R., pendant toute la durée de l'expérience. Les infections nouvelles sont notées quotidiennement jusqu'à 7 jours après la pulvérisation. 20 capsules sont inoculées à côté de 20 capsules témoins non inoculées, mais mises dans les mêmes conditions.

Les capsules sont également inoculées par piqûres : chaque champignon est introduit au centre d'une loge. Après 7 jours d'incubation à 26°C et 80 % H.R., les capsules sont ouvertes et on calcule le nombre moyen de loges atteintes par capsule et le grade moyen d'attaque (0 = loge saine; 1 = attaque visible; 2 = pourriture nette; 3 = loge complètement pourrie).

### RÉSULTATS

#### Comparaison avec *Colletotrichum gossypii* South.

##### Pouvoir pathogène

##### 1. Infection des plantules

Les résultats du tableau 1 montrent que la mortalité de pré-émergence dans les semis malades n'est pas différente de celle du témoin.

Elle débute après la levée et elle est importante dans les deux cas, mais significativement (au seuil P = 0,01) plus rapide et plus forte avec *Colletotrichum gossypii*.

Les plantules survivantes se répartissent comme suit :

— As (*C. gossypii*) : les rares plantules survivantes (2,6 %) présentent toutes une forte nécrose de collet qui aurait entraîné la destruction du jeune plant ;

— Ra (*Colletotrichum* - ramulose) : un nombre plus important de plantules a survécu (34,1 %) : 88,5 % de ces plantules sont nécrosées dont 42,4 % très fortement; 11,5 % des plantules sont saines.

TABLEAU 1. — Mortalité observée (en % des plantules) après inoculation des graines par les *Colletotrichum* responsables, respectivement, de l'antracnose et de la ramulose

Objet	Emergence %	Mortalité observée (%)			Pl. survivantes %
		+ 6 j	+ 8 j	+ 10 j	
As .....	78,2	50,7	95,1	97,4	2,6
Ra .....	79,2	17,4	52,7	65,9	34,1
Témoin non inoculé ..	79,3				79,3

##### 2. Infection des plants jeunes

Après 2-3 jours, dans le cas de Ra, les premiers symptômes apparaissent sous la forme d'une nécrose du bourgeon terminal

ou de taches sur les feuilles les plus jeunes, plus rarement par des taches sur les nervures ou les bords des feuilles plus âgées, plus rarement encore sur le pétiole et la tige principale (tabl. 8). Par la suite, on observe généralement une destruction du bourgeon terminal, puis un développement anarchique et une pousse de feuilles vraies au niveau du nœud cotylédonaire. Enfin, après 10-15 jours, il se produit souvent un redémarrage axillaire sain qui reprend la dominance apicale.

*C. gossypii* ne provoque aucun de ces symptômes, si ce n'est parfois des taches sur les nervures ou les pétioles, mais qui n'évoluent jamais vers la désorganisation de la croissance.

### 3. infection des capsules

Par pulvérisation, les deux champignons sont capables de provoquer des dégâts primaires de la capsule mais, comme pour les plantules, *C. gossypii* attaque plus rapidement et plus fortement (tabl. 2). A 7 jours, les capsules peuvent être réparties ainsi (%) :

	A <sub>2</sub>	Ra <sub>2</sub>
Capsules saines .....	11,8	47,1
Capsules avec taches isolées .....	17,6	41,2
Capsules complètement pourries .....	70,6	11,7

Par piqûres, après 7 jours, avec A<sub>2</sub>, on a 3,4 loges atteintes par capsule et le grade moyen d'attaque est de 1,65. Avec Ra<sub>2</sub>, ces deux chiffres sont de 3,1 et 1,38. *C. gossypii* progresse donc plus rapidement à l'intérieur de la capsule.

TABLEAU 2. — Capsules avec symptômes d'attaque externe (%)

Objet	Nombre de jours après l'inoculation				
	+ 3 j	+ 4 j	+ 5 j	+ 6 j	+ 7 j
A <sub>2</sub> .....	23,5	32,3	38,2	38,2	38,2
Ra <sub>2</sub> .....	0	29,4	47,0	47,0	52,9



FIG. 2. — Aspect en culture (Czapeck + extrait de levure) de *C. gossypii* et du *Colletotrichum* responsable de la ramulose.

rayons, assez bien marqués mais droits, comme beaucoup d'autres champignons dont de nombreux *Colletotrichum*. Par contre, sur Czapeck + extrait de levure, il n'y a pas formation de rayons.

En préparation microscopique, on observe que les acervules du *Colletotrichum* de la ramulose sont mieux individualisés et plus petits; ils portent des soies brunes, mais en moins grand nombre (fig. 3 et 4).

Les conidies sont identiques, dans les deux cas d'une longueur moyenne de 15 à 16 microns, mais avec des variations de 10 à 20 microns (conidies jeunes de cultures de 5 jours sur milieu petits pois gélosé).

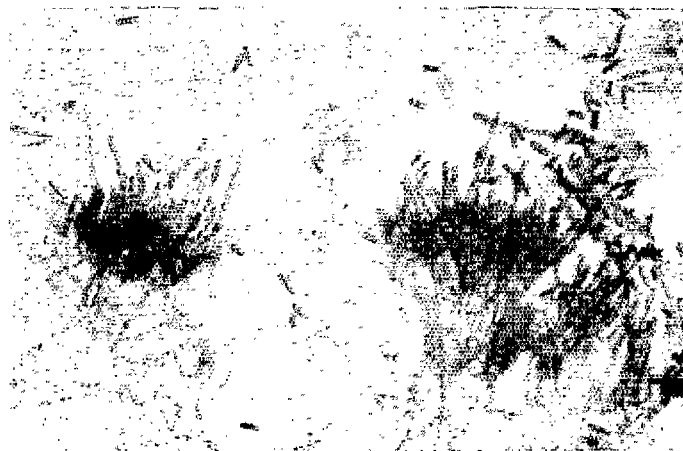


FIG. 3. — Acervules du *Colletotrichum* responsable de la ramulose ( $\times 80$ ).

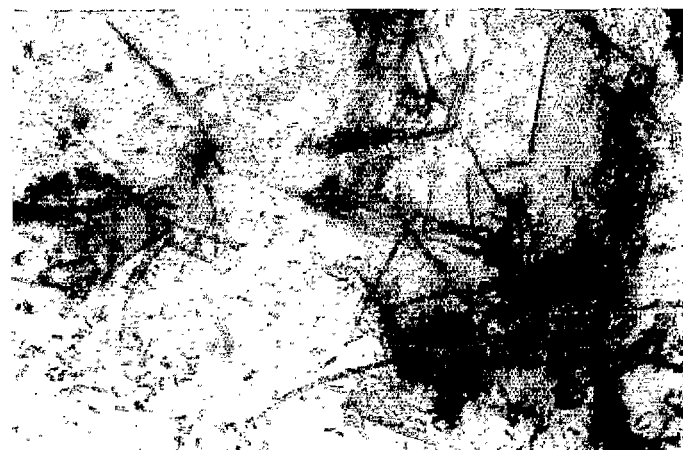


FIG. 4. — Acervules de *C. gossypii* ( $\times 160$ ).



FIG. 1. — Attaque après 7 jours d'incubation de *C. gossypii* (à gauche) et du *Colletotrichum* responsable de la ramulose.

### Morphologie

Les aspects des cultures sont très différents. Sur milieu petits pois et sur milieu Czapeck, *C. gossypii* donne une culture uniforme, de couleur rose saumon, due au grand nombre de conidies formées. La surface est homogène et on n'observe pas d'éléments en relief. L'agent de la ramulose (toutes les souches en notre possession) donne, sur milieu petits pois, une culture de couleur brune et l'aspect général est granuleux. Sur milieu Czapeck + extrait de levure, ce dernier champignon a un mycelium vert foncé avec, en relief, des pustules sombres marquées, sur les cultures jeunes, d'un point rose (fig. 2).

Comme MALAGUTTI (7), nous n'avons pas observé les rayons courbes signalés par VIEGAS (9) (*colonitis rotatis radiis recurvis*), mais ceci est un caractère non typique que l'on retrouve chez certains *Colletotrichum* ou *Glomerella*, saprophytes ou parasites. Sur milieu petits pois, les deux champignons ont des

## Croissance et sporulation

## 1. Influence de la température

Sur milieu petits pois, à 15, 20 et 25°C, *C. gossypii* croît légèrement, mais significativement (au seuil  $P = 0,01$ ) plus vite. À 30°C, on a un décrochement très net, *C. gossypii* est encore à une température de croissance quasi optimale, alors que le *Colletotrichum* de la ramulose a une croissance très ralentie (tabl. 3, fig. 5).

TABLEAU 3. — Croissance (mm) à 15, 20, 25 et 30°C de *C. gossypii* (A<sub>1</sub>) et de *Colletotrichum* agent de la ramulose (Ra<sub>2</sub>).  
(Tous les résultats sont significativement différents au seuil  $P = 0,01$ )

Températures	3 jours		5 jours		7 jours		14 jours	
	A <sub>1</sub>	Ra <sub>2</sub>	A <sub>1</sub>	Ra <sub>2</sub>	A <sub>1</sub>	Ra <sub>2</sub>	A <sub>1</sub>	Ra <sub>2</sub>
15 °C			17,5	15,2	33,4	29,0	71,2	62,7
20 °C	17,8	16,4	39,0	35,0	59,2	52,0		
25 °C	39,0	28,6	56,4	51,0	80,8	74,8		
30 °C	30,4	16,2	62,8	28,8				

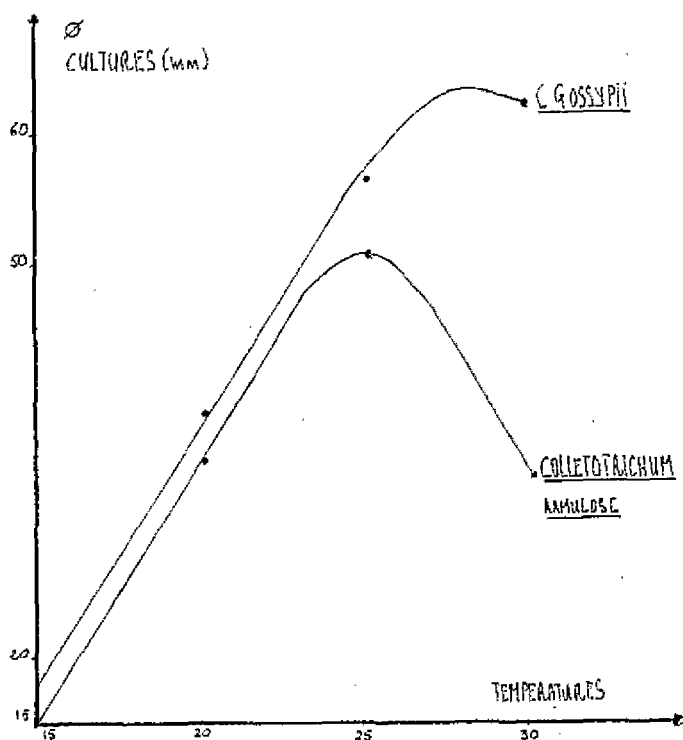


FIG. 5. — Croissance à 15, 20, 25 et 30°C de *Colletotrichum gossypii* et *C. gloeosporioides* var. *cephalosporioides*.

## 2. Influence du milieu de culture

La croissance et la sporulation ont été étudiées sur quatre milieux : bouillon de petits pois gélosé (PP), Czapeck (Co), Czapeck + extrait de levure (Cy), Czapeck + hydrolysate de caséine sans vitamines (Ch).

L'analyse des résultats (tabl. 4) montre que, globalement, A<sub>1</sub> croît plus vite que Ra<sub>2</sub>, mais ceci est dû à ce que Ra<sub>2</sub> ne pousse pratiquement pas sur milieu minéral et sur milieu minéral additionné d'acides aminés. Si l'on considère la croissance sur milieu petits pois et milieu Czapeck + extrait de levure, on observe une interaction significative : A<sub>1</sub> croît plus vite que Ra<sub>2</sub> sur petits pois, Ra<sub>2</sub> plus vite que A<sub>1</sub> sur Czapeck + extrait de levure.

Le point le plus intéressant est le fait que Ra<sub>2</sub> ne pousse pas sur milieu minéral sans vitamines, avec ou sans acides aminés.

L'addition de thiamine (100 µg/l) et de biotine (10 µg/l) restaure la croissance (tabl. 6).

En ce qui concerne la sporulation (tabl. 5), le milieu le plus favorable pour Ra<sub>2</sub> est le milieu petits pois ; pour *Colletotrichum gossypii*, ce même milieu est également favorable, mais la plus forte sporulation s'observe sur milieu Czapeck + extrait de levure, à l'obscurité.

L'addition de thiamine au milieu Czapeck restaure la croissance de Ra<sub>2</sub>, mais pas la sporulation qui demande la présence de biotine (tabl. 6).

TABLEAU 4. — Croissance de A<sub>1</sub> et Ra<sub>2</sub> sur milieu petits pois (PP), Czapeck (Co), Czapeck + extrait de levure (Cy) et Czapeck + hydrolysate de caséine sans vitamines (Ch) (mm après 5 jours à 26°C)

Milieu	A <sub>1</sub>	Ra <sub>2</sub>	$\bar{x}$
PP	47,0 D	44,0 B'	45,2 A''
Co	35,8 A	11,7 A'	23,7 B''
Cy	44,0 C	49,5 C'	46,7 A''
Ch	41,5 B	13,3 A'	13,3 B''
$\bar{x}$	42,1	29,6	

TABLEAU 5. — Sporulation (1 cm<sup>2</sup> de culture dans 5 ml d'eau) : nombre de spores  $\times 10^3$

Milieu	Lumière		Obscurité	
	A <sub>1</sub>	Ra <sub>2</sub>	A <sub>1</sub>	Ra <sub>2</sub>
PP	25,2	21,4	16,8	14,2
Co	4,4	0	2,3	0
Cy	19,4	5,6	54,5	5,1
Ch	16,0	0	15,8	0

TABLEAU 6. — Croissance (5 jours) et sporulation (7 jours) de Ra<sub>2</sub> et A<sub>1</sub> sur milieu Czapeck, Czapeck + biotine (10 µg/l) et Czapeck + thiamine (100 µg/l)

Milieu	Croissance (mm)		Sporulation (N $\times 10^3$ /ml)	
	A <sub>1</sub>	Ra <sub>2</sub>	A <sub>1</sub>	Ra <sub>2</sub>
Co	35,8	11,7	4,4	0
Co+Biotine	36,2	36,0	3,3	2,4
Co+Thiamine	37,1	36,7	1,9	0,2

## Conditions d'attaques

## Influence de l'humidité

La pulvérisation de spores sur des plantules croissant dans un milieu à 70-80 % d'humidité relative ne permet pas au champignon de provoquer des symptômes. Un certain temps à 100 % d'humidité relative est nécessaire, de l'ordre de 8 à 12 h pour des températures comprises entre 21 et 25°C (tabl. 7).

## Influence de la température

Si, après l'inoculation, on laisse les plants à 100 % H.R. pendant 24 heures, on constate que la température idéale d'attaque se situe autour de 25°C : à 30°C, le pourcentage d'attaques est nettement inférieur ; à 32°C, il devient nul. Ces résultats concordent avec les exigences du champignon *in vitro* : à 30°C, la croissance est très ralentie. Les spores germent vraisemblablement plus difficilement à cette température sur la plante.



TABLEAU 7. — Infection (%) après différents laps de temps à 100% H.R. (comptage 6 jours après l'inoculation)

Temps (h)	Températures	
	21 °C	25 °C
0	0 A	0 A
8	0 A	18.7B
16	58.1B	54.9C
24	73.4B	93.3D
48	99.2C	100 D

TABLEAU 8. — Infection et sites d'attaque sur jeunes plants de cotonniers (%), 10 jours après l'inoculation

	Températures			
	20 °C	25 °C	30 °C	32 °C
Plantes atteintes .....	94.5	100	37.5	0
Points d'attaques				
Bourgeon terminal ..	44.5	46.7	0	
Dernier entre-nœud ..	28.0	33.3	0	
Hypocotyle .....	0	20.0	0	
Pétioles .....	33.3	13.3	0	
Feuilles jeunes ....	55.6	53.3	63.0	
Feuilles âgées				
Bord du limbe .....	16.7	28.7	25.0	
limbe .....	16.7	13.3	6.3	
nerveure .....	22.2	28.7	25.0	

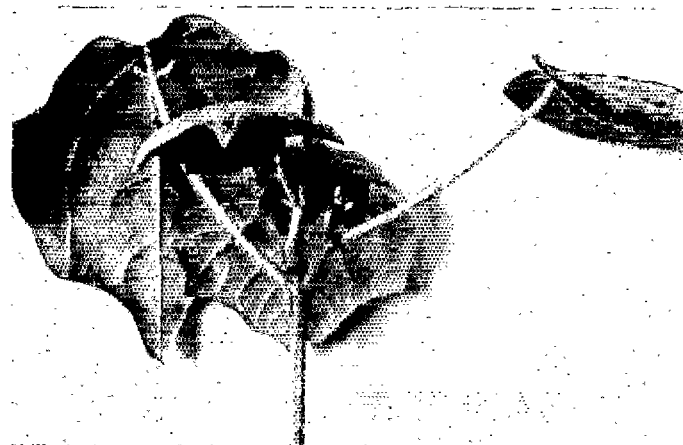


FIG. 6. — Attaque du bourgeon terminal et repousse axillaire saine reprenant la dominance apicale.

## DISCUSSION

Les pouvoirs pathogènes de ces deux champignons sont très différents. Si, comme l'a déjà montré COSTA (1), les deux *Colletotrichum* peuvent provoquer des destructions de plantules et des lésions sur capsules (et sont donc virulents sur ces deux types de tissus), leur agressivité est différente, *C. gossypii* étant nettement plus agressif, comme le montrent la rapidité d'apparition et l'importance des symptômes. Le *Colletotrichum* responsable de la ramulose est, par contre, seul capable d'attaquer les méristèmes et de provoquer cet aspect en balais caractéristique. En résumé, on peut faire le tableau suivant (V: virulent; +: degré d'agressivité):

	Plantules	Capsules	Méristèmes
<i>C. gossypii</i> .....	V**	V**	Non virulent
<i>C. de la ramulose</i> ..	V*	V*	V

La morphologie est différente, tant macroscopique que microscopique, et surtout les exigences de température sont différentes: alors que *C. gossypii* est encore à une température optimale à 30°C, le *Colletotrichum* de la ramulose a une croissance très ralentie à cette température.

La croissance et la sporulation sont également très différentes. Le point le plus remarquable étant que, au contraire de *C. gossypii*, l'autre *Colletotrichum* ne pousse pas sur milieu minimal strict. Toutes les souches isolées présentent une déficience marquée en biotine.

Ces observations montrent donc qu'il existe des différences importantes, qui ne se limitent pas aux faciès parasitaires, entre les *Colletotrichum* de l'anthracnose et de la ramulose. Il y a, certes, des variations à l'intérieur de chaque population et cela a été maintes fois signalé (4; 5; 6; 7; 10) mais, entre les deux populations, les différences sont trop importantes pour que l'on puisse envisager que le *Colletotrichum* de la ramulose soit issu de *C. gossypii* à la suite d'une évolution récente, par mutation et encore moins par la recombinaison sexuelle, puisque les deux organismes en sont dépourvus (la forme *Glomerella*, décrite par EPCERON, appartenant vraisemblablement à un *Colletotrichum* saprophyte, comme il en existe beaucoup sur le cotonnier (4).

Les points de ressemblance que l'on peut constater sont, en réalité, des points communs à tous les *Colletotrichum* à spores

ellipsoïdes que VON ARX a regroupés sous le même nom spécifique de *C. gloeosporioides* Penz. (11). Si on veut faire de ces deux *Colletotrichum* une même espèce, c'est sous ce nom qu'il est possible de les regrouper mais, en aucun cas, on ne peut faire du *Colletotrichum* de la ramulose une variété de *C. gossypii*. À la rigueur, on peut définir ce pathogène comme *C. gloeosporioides* Penz. var. *cephalosporioides* Costa, bien que ce dernier qualificatif n'ait pas été défini par une diagnose précise, mais compte tenu de l'usage qui en est fait depuis 40 ans.

Ces résultats n'ont pas été exposés uniquement dans un but de clarification taxonomique, car d'un point de vue pratique, si on admet, ce qui semble le plus vraisemblable, que le *Colletotrichum* de la ramulose n'est pas une race issue de *C. gossypii*, le risque est nul de voir cette maladie apparaître, dans un pays où elle n'existe pas, à partir d'autres souches de *Colletotrichum*. Son apparition dans un nouveau pays est liée à l'introduction d'éléments végétaux contaminés ou à l'extension de zones cotonnières de pays limitrophes.

Les études sur les conditions de milieu nécessaires à l'infection indiquent qu'une période de 8 à 12 heures à 100% d'humidité relative autour de 25°C est suffisante pour provoquer un pourcentage élevé d'attaques. Ceci correspond à une nuit de période humide ou à une journée pluvieuse, c'est-à-dire à une exigence souvent satisfaite, ce qui explique l'évolution rapide dans les champs attaqués.

Les repousses saines observées en milieu contrôlé correspondent à des observations réalisées dans les conditions naturelles où on peut souvent voir des attaques précoces surmontées par le cotonnier si une période sèche a suivi la première infection. Il est vraisemblable que l'évolution de la maladie est la suivante: attaque du bourgeon terminal, perte de la dominance apicale, repousse à partir d'un bourgeon axillaire, puis deux cas possibles: 1) les conditions ne sont pas favorables à la réinfection et la repousse est saine; 2) les conditions sont favorables, il y a sporulation sur les lésions et réinfection de la repousse, ce qui conduit à un nouveau redépart axillaire et à la formation du balai de sorcière caractéristique de cette maladie.

## REFERENCES

1. COSTA A.S., 1939. — Infestação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* et *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. J. Agric. (Piraciba), 2, 265-270.
2. COSTA A.S., FRAGA Jr., 1937. — Superbrotamento ou ramulose de algodoeiro. J. Agric. (Piraciba), 12, 249-259.
3. COSTA A.S., FRAGA Jr., 1939. — Sobre a natureza de ramulose ou superbrotamento de algodoeiro. J. Agr. (Piraciba), 2, 151-160.
4. FOLLIN J.-C., 1969. — Sur les différentes formes de *Glomerella* et de *Colletotrichum* isolées du cotonnier. Cot. Fib. trop., 24, 3, 337-350.
5. FOLLIN J.-C., 1970. — Spécialisation physiologique chez *Colletotrichum gossypii* South. Cot. Fib. trop., 25, 3, 387-388.
6. LIMA E.F., 1980. — Variabilidade de *Colletotrichum gossypii* South. var. *cephalosporioides* Costa. M.S. Universidade Federal de Vicosa.
7. MALAGUTTI G., 1955. — La escobilla del algodón en Venezuela. Agron. Trop. (Macaray, Venez.), 5, 73-86.
8. MATHIESON T., V. MANGANO, 1981. — Ensayos fitopatológicos en algodón 1980-1981. Rapport station I.A.N. de Caacupe, non publié.
9. VIEGAS A.P., 1946. — Algunos fungos do Brasil. XII. Fungi imperfecti-Melanconiales. *Bragantia* (Brasil), 6, 5-7.
10. ULLSTRUP A.J., 1938. — Variability of *Glomerella gossypii* Edg. *Phytopath.*, 28, 787-793.
11. VON ARX J.A., 1957. — Die Arten der gattung *Colletotrichum* Cda. *Phytopath. Z.*, 29, 413-463.

## Estudio sobre la ramulose del algodonero

### Comparación del *Colletotrichum* responsable con *C. gossypii* South. Condiciones de ataque

J.C. Follin\* y V. Mangano\*\*

\* Centre de recherches du G.E.R.D.A.T., B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex.

\*\* I.A.N. Caacupe, Paraguay.

#### RESUMEN

La comparación del *Colletotrichum*, agente de la ramulose del algodonero y del *Colletotrichum*, agente de la antracnosis, (*C. gossypii* South) muestra que estos dos patógenos no difieren solamente en el poder patógeno (virulencia y agresividad), sino también en la morfología, el crecimiento sobre diferentes medios y la aptitud a crecer por encima de 30°C. Estas diferencias no permiten considerar al agente de la ramulose como un cultivo

particular de *C. gossypii* South. Se propone como denominación: *Colletotrichum gloeosporioides* Penz var. *cephalosporioides* Costa para el patógeno responsable de la ramulose.

Para provocar síntomas, el hongo necesita al menos 8 a 10 hs. con cerca de 100 % H.R. a una temperatura de cerca de 25°C. Un periodo de sequía permite la recuperación de la planta.

#### INTRODUCCIÓN

En 1931, en varias plantaciones de algodón del este del Paraguay (zona de Chore y de Caaguazu) apareció una enfermedad desconocida hasta entonces en este país. Los algodones atacados toman un aspecto ramificado anormal y estas ramificaciones tienen más importancia cuando la enfermedad aparece tempranamente, los entrenudos son cortos y los nudos se hinchan. Las hojas son más pequeñas, de color verde oscuro, los limbos presentan al nivel de las nervaduras necrosis circulares, de un color rojo, que provocan un desarrollo desigual de las hojas, y dan frecuentemente un aspecto despedazado a las hojas más viejas. En la parte superior del tallo principal y sobre las ramas jóvenes las lesiones son visibles, lo mismo que sobre las cápsulas, donde también frecuentemente son observadas las acervulas de *Colletotrichum*.

Estos síntomas corresponden, a aquellos de la ramulose o superbrotamento, enfermedad del algodonero descrita por la primera vez por COSTA y FRAGA en 1937 (2) en Brasil y más recientemente por MALAGUTTI (7) en Venezuela (bajo el nombre de « escobilla »).

El aislamiento a partir de diferentes órganos enfermos (cápsulas, yemas terminales, ramas) de un mismo *Colletotrichum* y el éxito de las primeras pruebas de patogenidad confirmaron este diagnóstico (8).

No se pudo encontrar una descripción clara de este último hongo y los síntomas de la antracnosis y de la ramulose son bien diferenciados, razón por la cual nos ha aparecido útil de verificar si el *Colletotrichum* de la ramulose llamado *C. gossypii* South, var. *cephalosporioides* Costa por COSTA y FRAGA (3) es realmente una cepa particular salida de *C. gossypii* South, o si este hongo se agrupa, como *C. gossypii* al gran grupo de *C. gloeosporioides* Penz, en el concepto de VON ARX (10).

Por otra parte las condiciones más favorables para que el *Colletotrichum* de la ramulose pueda provocar síntomas en el algodonero fueron buscados en medios con temperatura controlada.

#### MATERIALES Y METODOS

En las pruebas preliminares no se han observado diferencias en las cepas causantes de la ramulose (originarias de Chore y Caaguazu) por una parte, y en aquellas que provocan la antracnosis (originarias de Costa de Marfil y de Africa Central) por otra parte. Solo dos cepas fueron conservadas: una, aislada de tallos, de Caaguazu, para la ramulose: Ra, y por la antracnosis, la aislada en Africa Central: A<sub>2</sub>.

Los 2 hongos fueron cultivados sobre arveja hervida agar, y Czapeck solo o con extracto de levadura (3 g/l) o con caseína hidrolizada sin vitaminas (2 g/l).

##### Pruebas de patogenidad, inoculaciones artificiales

Todas las experiencias fueron realizadas a 25° C, 80 % H.R. y alternancia día-noche 12 h-12 h. La variedad de algodón utilizada es la Reba P 279 originaria del Paraguay (B 50 × DPSL).

**Plántulas:** las semillas fueron sumergidas, 2 h, en una solución de esporas (10<sup>7</sup> esporas/ml) después puestas a secar 12 h y sembradas en vermiculita embebida en una solución mineral nutritiva. Las plántulas muertas fueron contadas a los 6, 8, 10 días después de la siembra; a los 10 días las plántulas

vivas son arrancadas y observadas. Son realizadas 6 repeticiones de 16 semillas.

**Plantas jóvenes (20 a 25 días):** se pulveriza una solución de esporas (10<sup>7</sup> esporas/ml) sobre las plantas mantenidas durante un tiempo variable a 100 % H.R. La lectura de los resultados se realizó 6 días después. Fueron inoculadas 4 repeticiones de 8 a 10 plantas.

**Cápsulas:** sobre cápsulas cosechadas a 35-40 días y puestas en un recipiente a 26° C con 100 % H.R., durante toda la duración de la experiencia, la misma solución de esporas fue pulverizada. Cada día, las infecciones nuevas son anotadas, hasta el séptimo día de la pulverización. 20 cápsulas son inoculadas y 20 cápsulas no inoculadas como testigo y puestas en las mismas condiciones.

Las cápsulas fueron igualmente inoculadas por picaduras: cada hongo fue introducido en el centro de un lóculo. Después 7 días de incubación a 26° C, 80 % H.R., las cápsulas fueron abiertas y se calculó la media de lóculos atacados por cápsula y el grado medio de ataque (0 = lóculo sano, 1 = ataque visible, 2 = pudrición neta, 3 = lóculo completamente podrido).

## RESULTADOS

Comparación con *Colletotrichum gossypii* South.

## Poder patógeno

## 1. Infección de las plántulas

Los resultados del cuadro 1 muestran que la mortalidad de pre-emergencia de la siembra infectada no fue diferente de la del testigo.

La mortalidad se inicia después de la germinación, y es importante en los dos casos, significativamente ( $P = 0,01$ ) más rápida y más fuerte en *Colletotrichum gossypii*.

Las plántulas sobrevivientes se reparten como sigue:

- $A_0$  (*C. gossypii*): las raras plántulas sobrevivientes (2,6%) presentan una fuerte necrosis del cuello que va producir la destrucción de la plántula.
- $R_{A_0}$  (*Colletotrichum ramulose*): un número más importante de plántulas sobrevivió (34,1%); 38,5% de estas plántulas tenían necrosis, de donde 42,4% muy fuertemente, 11,5% de las plántulas sanas.

## 2. Infección de las plantas jóvenes

Después 2-3 días, en el caso de  $R_{A_0}$ , los primeros síntomas aparecieron bajo la forma de una necrosis de la yema terminal o manchas sobre las hojas más jóvenes; más raramente como manchas sobre las nervaduras o los bordes de las hojas viejas, con menos frecuencia sobre el peciolo y el tallo principal (cuadro 8). Posteriormente se observa en general una destrucción de la yema terminal, después un desarrollo anormal, y una brotación de hojas verdaderas al nivel del nudo cotiledonar. Al final, después 10-15 días, se produce a menudo una rebrotación axilar sana que retoma la dominancia apical.

*C. gossypii* no provoca ninguno de estos síntomas, aunque algunas veces produce manchas sobre las nervaduras o los peciolos, pero que jamás evolucionan hacia la desorganización del crecimiento.

## 3. Infección de las cápsulas

Pulverizando, los dos hongos son capaces de provocar daños primarios de la cápsula, pero, como en las plántulas, *C. gossypii* ataca más rápidamente y fuertemente (cuadro 2).

A los 7 días, la repartición del daño en las cápsulas se puede hacer en las siguientes clases (5%):

	$A_0$	$R_{A_0}$
Cápsulas sanas .....	11,8	47,1
Cápsulas con manchas aisladas .....	17,6	41,2
Cápsulas completamente podridas .....	70,6	11,7

Por picadura, después 7 días, con  $A_0$ , se tiene 3,4 lóculos atacados por cápsula y el grado medio de ataque es de 1,65. Con  $R_{A_0}$  es 3,1 lóculos atacados por cápsula y 1,38 el grado medio de ataque. *C. gossypii* progresa más rápidamente en el interior.

## Morfología

El aspecto de los cultivos es muy diferente de la cápsula. Sobre el medio con arveja y sobre medio Czapeck, *C. gossypii* da un cultivo uniforme, de color rosa salmon, debido al gran número de conidios formados. La superficie es homogénea y no se observan elementos en relieve. El agente de la ramulose (todas las cepas que poseemos) da en el medio con arveja, un

cultivo de color pardo y de aspecto general granulado; en medio Czapeck + extracto de levadura, este último hongo tiene un micelio verde oscuro con, en relieve, pústulas oscuras marcadas y sobre los cultivos jóvenes de un punto rosado (fig. 2).

Como MLAGUTTI (7), nosotros no observamos las rayas curvas, señaladas por VIEGAS (9) (*Coloniis rotatis radiis recurvis*), pero este es un caracter no típico que se encuentra frecuentemente en ciertos *Colletotrichum* o *Glomerella* saprofiticos o parásitos. En medio con arveja, los dos hongos tienen rayas, muy bien marcadas pero derechas como muchos otros hongos, entre los cuales, numerosos *Colletotrichum*. Por el contrario, sobre Czapeck + extracto de levadura no existe formación de rayas.

En preparación microscópica se observa que las acervulas del *Colletotrichum* de la ramulose son mejor individualizadas y más pequeñas, ellas llevan setas oscuras pero en menor número (fig. 3 y 4).

Los conidios son idénticos, en ambos casos de un largor medio de 15 a 16 micrones pero con variaciones de 10 a 20 micrones (conidios jóvenes de cultivos de 5 días sobre medio arveja agar).

## Crecimiento y esporulación

## 1. Influencia de la temperatura

Sobre medio con arveja, a 15, 20 y 25° C, *C. gossypii* crece ligeramente pero significativamente más rápido (al  $P = 0,01$ ). A 30° C, hay una diferencia muy neta, *C. gossypii* se encuentra todavía a una temperatura de crecimiento casi óptima mientras que el *Colletotrichum* de la ramulose crece muy lentamente (tabla 3, fig. 5).

## 2. Influencia del medio de cultivo

El crecimiento y la esporulación fueron estudiados sobre 4 medios: arveja agar (PP), Czapeck (Co), Czapeck + extracto de levadura (Cy), Czapeck + caseína hidrolizada sin vitaminas (Ch).

El análisis de los resultados (tabla 4) muestra que, en general,  $A_0$  crece más rápido que  $R_{A_0}$ , pero esto es debido a que  $R_{A_0}$  no crece prácticamente sobre medio mineral o sobre medio mineral con adición de amino ácidos. Si se considera los resultados de crecimiento sobre arveja agar y Czapeck + extracto de levadura, se observa una interacción que es significativa:  $A_0$  crece más rápido que  $R_{A_0}$  sobre arveja y  $R_{A_0}$  más rápido que  $A_0$  sobre Czapeck + extracto de levadura.

El punto más interesante es el hecho que  $R_{A_0}$  no crece sobre medio mineral sin vitaminas, con o sin áminos ácidos.

La adición de tiamina (100 µg/l) y de biotina (10 µg/l) restablece el crecimiento (tabla 6).

En lo que concierne la esporulación (tabla 5), el medio más favorable para  $R_{A_0}$  es el medio con arveja; para *Colletotrichum gossypii*, este mismo medio es igualmente favorable, pero la mayor esporulación se observa sobre Czapeck + extracto de levadura, en la oscuridad.

La adición de tiamina a Czapeck restablece el crecimiento de  $R_{A_0}$ , pero no la esporulación que necesita la presencia de biotina (tabla 6).

## CONDICIONES DE ATAQUE

## Influencia de la humedad

La pulverización de esporas sobre plántulas que crecen en un medio con 70-80% H.R., no permite al hongo de provocar síntomas. Un cierto tiempo a 100% H.R. es necesario, del orden de 8 a 12 hs, con temperaturas comprendidas entre 21 y 25° C (tabla 7).

## Influencia de la temperatura

Si después de la inoculación se dejan las plantas a 100% H.R., durante 24 hs, se constata que la temperatura ideal de ataque se sitúa alrededor de 25° C, a 30° C el porcentaje de ataque es netamente inferior, a 32° C no hay crecimiento. Estos resultados concuerdan con las exigencias del hongo *in vitro*: a 30° C

el crecimiento disminuye bastante. Es probable que las esporas germinen difícilmente a esta temperatura sobre la planta.

Pero además, a 30° C el ataque se limita a las hojas mientras que a temperaturas inferiores ataca generalmente la yema terminal. Y es este último tipo de ataque que es el más importante ya que desorganiza el crecimiento (tabla 8).

Después, a unos 10 días aproximadamente, a 25° C, a 70-80% H.R. se puede observar sobre las plantas que tuvieron la yema terminal destruida, producir una rebrotación sana (fig. 6), que no será re infectada salvo si se pone la planta en presencia de esporas a 100% H.R. Este proceso se ve acelerado si se transportan las plantas de 25 a 30° C.

## DISCUSIÓN

El poder patógeno de estos dos hongos es muy diferentes. Si, como lo ha ya mostrado COSTA (1), los dos *Colletotrichum* pueden provocar destrucción de plántulas y lesiones en cápsulas (y son entonces virulentos sobre estos dos tipos de te-

jido) su agresividad es diferente, *C. gossypii* es netamente más agresivo como lo muestra la rapidez de aparición y la importancia de los síntomas. El *Colletotrichum* responsable de la ramulose es por el contrario solamente capaz de atacar los



meristemas y de provocar este aspecto de escoba característico. En resumen, se puede hacer la tabla siguiente:

	Plantulas	Cápsulas	Meristemas
<i>C. gossypii</i> .....	V**	V**	Nº virulento
<i>C. de la ramulose</i> ....	V*	V*	V

(V: virulento; \*: grado de agresividad).

La morfología es diferente, tanto macroscópica como microscópica y sobre todo las exigencias en temperatura son diferentes; mientras que *C. gossypii*, a 30° C esta a una temperatura óptima de crecimiento, el *Colletotrichum* de la ramulose, crece muy lentamente.

El crecimiento y la esporulación son igualmente muy diferentes. El punto más remarcable, es que al contrario de *C. gossypii*, el otro *Colletotrichum* no crece sobre medio mineral estricto. Todas las cepas aisladas presentan una diferencia marcada en biotina.

Estas observaciones muestran que existen diferencias importantes entre ambos *Colletotrichum* que no se limitan al aspecto parasitario. Hay ciertas variaciones al interior de cada población y esto ha sido varias veces señalado (4, 5, 6, 7, 10), pero entre las dos poblaciones, las diferencias son muy importantes para que se pueda considerar que el *Colletotrichum* de la ramulose se haya originado de *C. gossypii* después de una evolución reciente, por mutación y todavía menos por la recombinación sexual, porque los dos organismos no lo poseen (la forma *Glomerella* descrita por EDGERTON pertenece probablemente a un *Colletotrichum* saprofítico, como los muchos que existen sobre el algodón [4]).

Los puntos de semejanza que se pueden constatar son en realidad los puntos comunes a todos los *Colletotrichum* de esporas elipsoides que VON ARX ha reagrupado sobre el mismo nombre de *C. gloeosporioides* Penz (11). Si se quiere hacer de estos dos *Colletotrichum* una misma especie, es bajo esta deno-

minación que es posible reagruparlos, pero en ningún caso, se puede hacer del *Colletotrichum* de la ramulose una variedad de *C. gossypii*. Si acaso, se puede definir este patógeno como *C. gloeosporioides* Penz var. *cephalosporioides* Costa, aunque este último calificativo no ha sido definido por una descripción precisa, pero teniendo en cuenta que ha sido utilizado desde hace 40 años.

Estos resultados no fueron expuestos con un fin únicamente de clarificación taxonómica, sino desde un punto de vista práctico, si se admite que el *Colletotrichum* de la ramulose no es una raza originada de *C. gossypii*, el riesgo de ver aparecer, en un país donde no existe, a partir de otras cepas de *Colletotrichum*, es nulo. Su aparición en otro país, esta ligado a la introducción de elementos vegetales contaminados o a la extensión de zonas algodoneras de países limítrofes.

Los estudios de las condiciones del medio ambiente necesarias a la infección indican que un periodo de 8 a 12 hs a 100 % H.R. con alrededor de 25° C es suficiente para provocar un porcentaje elevado de ataque. Esto corresponde a una noche de periodo húmedo o a un día lluvioso, es decir a una exigencia a menudo satisfecha, lo que explica la rápida evolución en los campos atacados.

Los brotes sanos observados en medio controlado corresponden a las observaciones realizadas en condiciones naturales donde se puede ver ataques tempranos superados, si un periodo seco sigue a la 1ª infección. Es probable que la evolución de la enfermedad sea la siguiente: ataque de la yema terminal, pérdida de la dominancia apical, rebrotación de las yemas axilares y allí dos casos son posibles: 1) las condiciones no son favorables a la reinfección y el brote es sano; 2) las condiciones son favorables, hay esporulación sobre las lesiones y reinfección del brote, lo que conduce a un nuevo rebrote axilar y a la formación de escoba de bruja característica de esta enfermedad.

#### SUMMARY

A comparison of the *Colletotrichum*, the pathogen responsible for cotton ramulosis, with the *Colletotrichum*, the anthracnose pathogen (*C. gossypii* South), shows that the two pathogens differ not only in their pathogenicity (virulence and aggressivity), but also in their morphology, their growth on various media and their ability to develop below 30°C. These differences prevent making the ramulosis pathogen a special cultivar of *C. gossypii* South. The name of « *Colletotrichum gloeosporioides* » Penz. var. *cephalosporioides* Costa is proposed for the pathogen responsible for ramulosis.

To cause symptoms to develop, this fungus requires a relative humidity of about 100 % and a temperature of about 25°C for at least 8 to 10 hours. A period of drought cures the plant if it already has the disease.